



TITLE:

苔類ゼニゴケにおける離生細胞間隙形成を伴う気室形成制御機構の解析(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

水谷, 未耶

CITATION:

水谷, 未耶. 苔類ゼニゴケにおける離生細胞間隙形成を伴う気室形成制御機構の解析. 京都大学, 2017, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20524>

RIGHT:

許諾条件により本文は2018-03-22に公開

京都大学	博士（生命科学）	氏名	水谷未耶
論文題目	苔類ゼニゴケにおける離生細胞間隙形成を伴う気室形成制御機構の解析		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>植物の細胞間隙は、呼吸や光合成の基質である酸素や二酸化炭素を植物の体内に行き渡らせる上で重要な組織構造である。細胞間隙には発生学的な由来から細胞と細胞の接着が剥離することで形成される離生細胞間隙と細胞死によって形成される破生細胞間隙がある。ゼニゴケは陸上植物進化の基部に位置する苔類に属し、葉状体の背面に離生細胞間隙を持つ構造である気室を形成する。ゼニゴケ気室発生の分子機構を明らかにすることで細胞間隙形成制御機構の解明を進めた。</p> <p>ゼニゴケ気室形成制御に関する分子機構の理解を目的として、気室形成異常株 <i>nopper abo1 (nop1)</i> の変異原因遺伝子の同定および機能解析を行った。<i>nop1</i> 変異体は発生初期において葉状体背面組織の前表皮層二層の分化は確認されるが、表皮層細胞間で起こる細胞間隙形成が全く見られない。また、発生が進むと最外層の細胞は表皮へと分化するが、正常な気室の内部に形成される同化糸細胞の分化は全く見られない。これらの観察結果より、<i>nop1</i> 変異体では気室発生の初期段階である細胞間隙形成に異常があり、その結果気室が発生しないと結論した。原因遺伝子を同定したところ、<i>NOP1</i> はU-boxとアルマジロリピートをもつ、Plant U-box（PUB）ファミリーに属するE3ユビキチンリガーゼをコードすることが推定された。精製組換えNOP1タンパク質は、<i>in vitro</i> でU-box依存的な自己ユビキチン化活性を示し、E3ユビキチンリガーゼとして機能することが示唆された。蛍光観察及び細胞分画による局在解析により、NOP1は細胞膜に局在することを明らかにした。これらの結果よりゼニゴケの気室発生では、細胞膜に局在するE3ユビキチンリガーゼNOP1が、発生初期の離生細胞間隙形成を抑制しているタンパク質を分解することで、細胞間隙形成を正に制御するというモデルが考えられた。</p> <p>次にNOP1の標的タンパク質や制御タンパク質を単離することを目的として、NOP1結合タンパク質を探索し、得られた候補因子について機能欠損株を作出し、表現型を解析することで関連因子の同定を試みた。U-boxを欠く不活性型NOP1-Citrineを発現する形質転換体を用いて抗GFP抗体による免疫沈降を行い、沈降物に対してタンパク質質量分析を行った。得られた多数のNOP1結合タンパク質候補から選定した候補因子についてCRISPR/Cas9ゲノム編集システムによって機能欠損株の作出を行い、表現型の観察を行ったところ、複数の機能欠損株で気室形成に異常が確認され、NOP1と協働して気室形成に関与する可能性のある因子が複数単離された。その中でも、微小管とセルロース合成酵素の双方に結合して働くことが示唆されているCSI1（Cellulose Synthase Interactive 1）のオーソログに注目し、さらなる解析を行った。その結果、ゼニゴケCSIの機能欠損株では、気室形成密度が低下すること、気室形成が起こる領域でも形態の異常な気室や気室孔が形成されることが分かった。このことからCSIは気室形成に必要な因子であると考えられ、CSIは微小管と細胞壁合成酵素の制御を介して気室形成を正に制御することが示唆された。</p> <p>本研究によって、ゼニゴケの気室形成にはPUB E3ユビキチンリガーゼであるNOP1による標的タンパク質の分解が必須であること、さらにNOP1複合体構成タンパク質として同定した複数のタンパク質が気室形成に関与すること、微小管やセルロース合成酵素の制御が重要であることが示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、植物体内に酸素や二酸化炭素を供給するのに重要な細胞間隙形成に興味をもち、その形成機構を研究した。まずゼニゴケの細胞間隙を有する構造である気室の形成に異常を示す突然変異体を解析し、その原因遺伝子の同定および機能を推定した。T-DNA挿入変異により得られたゼニゴケ気室形成突然変異体 *nop1* について、発生段階初期の細胞間隙形成から異常を示すことを示した。次に原因遺伝子を同定し、U-BoxとアルマジロリピートをもつPUBファミリーに属するE3ユビキチンリガーゼをコードすることを明らかにした。精製組換えタンパク質を用いた生化学的手法によりNOP1がE3ユビキチンリガーゼ活性を有することを証明した。また、蛍光レポータータンパク質を用いた細胞内局在観察や細胞分画を用いた分離と抗体検出法により、NOP1が細胞膜に局在することを示した。これらの結果から、ゼニゴケの気室発生では、E3ユビキチンリガーゼNOP1が発生初期に離生細胞間隙を抑制するタンパク質を分解することで細部間隙形成を正に制御するというモデルを提唱している。これまで未解明であった離生細胞間隙形成に関して、関与する制御系を見出してから制御モデルを提唱するに至った点は評価できる。

次に、NOP1が関与する制御の分子的な実体をさらに明らかにするため、NOP1結合タンパク質を探索し機能解析を行った。E3活性を欠く変異を導入したNOP1を用いて、質量分析器を用いたプロテオーム手法でNOP1と共沈降するタンパク質を同定した。多数のタンパク質が得られたが、生化学的な機能予測や細胞内局在予測により候補の絞り込み、最終的に多数の遺伝子に対してゲノム編集を行うことで、変異すると気室形成に異常を示す因子を見出した。特に、このなかに微小管とセルロース合成酵素に結合して働くとされる因子CSIを同定した。微小管と細胞壁合成酵素の制御を介して気室形成を正に制御するという可能性を提起したいことは、気室形成の機構に関して大きな知見を与えたものとして評価できる。

以上のように、本論文はゼニゴケという新たな世代モデル生物の気室発生という特殊な発生現象に着目し、植物に共通して重要である細胞間隙形成制御という普遍的かつ重要な研究分野に新たな知見を与えたものであり、植物の発生研究の進展に貢献する価値を備えている。また、新たなモデル生物であるゼニゴケで初めて順遺伝学的に単離された変異体からその原因遺伝子同定を行った点や、新たなモデル生物の利用が研究の展開につながることを示した点も評価に値する。

本論文では、申請者の遺伝学、分子生物学、発生学、植物生理学、バイオインフォマティクスに関する高度で幅広い学識と研究の実践力、および、生命科学に関する研究を独創的かつ総合的に展開する能力も示されている。また、生命科学の知識蓄積と発展に寄与する発見が論理的かつ一貫性をもって記述されている。よって、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。また平成29年1月23日に論文内容とそれに関連する口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日